

JP8501925

Publication Title:

Monoclonal antibodies to glycoprotein P

Abstract:

Abstract not available for JP 8501925

(T) Abstract of corresponding document: US 5766946

(A) Translate this text PCT No. PCT/EP93/01533 Sec. 371 Date Dec. 15, 1994 Sec. 102(e) Date Dec. 15, 1994 PCT Filed Jun. 16, 1993 PCT Pub. No. WO93/25700 PCT Pub. Date Dec. 23, 1993A monoclonal antibody that recognises a structurally continuous and extracellularly-located epitope of human P-glycoprotein is described. The monoclonal antibody has a continuous amino acid sequence, and a binding affinity for the P-glycoprotein which manifests in the ability to stain greater than 90% of live CEM-VBL10 cells in a flow cytometry assay.

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-501925

(43) 公表日 平成8年(1996)3月5日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09			
A 6 1 K 39/395	A D U N	9284-4C	
C 1 2 P 21/08		9358-4B	
G 0 1 N 33/53	V	8310-2J	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00 A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-501138	(71) 出願人	イスティテュート・スペリオーレ・ディ・サニタ
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)6月16日		イタリア、イー00161ローマ、ピアレ・レ
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)12月16日		ジナ・エレナ299番
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 3 / 0 1 5 3 3	(72) 発明者	チャンフリグリア、マウリツィオ
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 2 5 7 0 0		イタリア、イー00042アンツィオ、ピア
(87) 国際公開日	平成5年(1993)12月23日		レ・メンカッチ3番
(31) 優先権主張番号	R M 9 2 A 0 0 0 4 5 7	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(32) 優先日	1992年6月17日		
(33) 優先権主張国	イタリア (I T)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖蛋白Pに対するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明はヒト糖蛋白質P (P g p) の構造上連続し、且つ細胞外に位置するエピトープを認識するモノクローナル抗体を規定するものであり、そのエピトープは、好ましくはヒトP g pの第4の細胞外ループに位置して、且つ特に配列番号1のペプチド中に含まれる、特異的に連続したエピトープを形成するアミノ酸配列から成り立っている。本発明に従って提起された抗体は、ヒトP g pと特異的に且つ強い結合力で結合し、それ故細胞集団が極めて低い割合でしか存在しない時、或いはヒトP g pが非常に低濃度でしか発現していない時に、ヒトMDR細胞の同定に用いる事ができる。このモノクローナル抗体は、抗体全体或いは、その抗原結合フラグメントであり、また組換えDNA技術により調製される事ができる。このモノクローナル抗体は、ヒトP g pを発現している細胞を、例えば不均一な細胞集団に含まれている時に同定したり或いは精製するのに有効であり、また細胞、例えば腫瘍細胞の複合薬剤耐性の状態を監視するのに有効である。

【特許請求の範囲】

1. エピトープを形成する連続的アミノ酸配列から成るヒトP g pの構造上連続して細胞外に位置するエピトープを認識する、モノクローナル抗体。

2. エピトープを形成するアミノ酸配列が、ヒトP g pの第4の細胞外ループに位置している、請求項1記載のモノクローナル抗体。

3. エピトープを形成するアミノ酸配列が、配列番号1のペプチドから成る、請求項2記載のモノクローナル抗体。

4. エピトープを形成するアミノ酸配列が、配列番号1の残基2から9までから成る8アミノ酸配列の中で少なくとも5残基連続したアミノ酸を含む、請求項3記載のモノクローナル抗体。

5. 5残基連続したアミノ酸が配列番号1の残基3から7までである、請求項4記載のモノクローナル抗体。

6. 重鎖可変ドメインのアミノ酸配列が配列番号2或いは3であるCDR自身かCDR変異体を有する可変ドメインを含むヒトP g pのモノクローナル抗体。

7. 各CDRが配列番号2或いは3に対応するCDRと少なくとも70%相同である、請求項6記載のモノクローナル抗体。

8. MM4.17モノクローナル抗体と同様のP g pに対する親和性を有する、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

9. 蛍光標識されたか、或いは固相上に固定化された、請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

10. ヒトMDR細胞、或いはヒトP g pの細胞外ドメインもしくはそのフラグメントに対応するペプチドで免疫された動物から得た脾臓細胞の体細胞融合を含む、請求項1～9のいずれかに記載のモノクローナル抗体の調製方法。

11. 構造的に連続するヒトP g pの細胞外ドメイン、もしくはその一部に対応するペプチドが、目的のモノクローナル抗体の選出に用いられる、請求項10記載の方法。

12. 請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマおよび形質転換された宿主細胞系。

13. ヒトMDR細胞、或いはヒトPgpを検出する為に請求項1～9のいずれかに記載のモノクローナル抗体を特異的試薬として含む、免疫的診断キット。

14. 不均一な細胞集団の中に存在してヒトPgpを発現する細胞を生体内で同定、或いは精製する為の、請求項1～9のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

15. MDRを逆転させるための治療剤としての、請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

16. MDRを逆転させるための、請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

17. 薬理学的に許容可能な担体或いはエキシピエント (excipient) と組合せた請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む、治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

糖蛋白Pに対するモノクローナル抗体

本発明はP-糖蛋白質(Pgp)に特異性を持つモノクローナル抗体に関するものである。特にヒトPgpの細胞外エピトープに対するモノクローナル抗体とその作成及び診断と治療上の使用に関するものである。

本願は、本明細書の末尾に記載されているかっこ内の文献番号により示された種々の文献を参照にしている。

コーラーとミルシュタインによって開発された(1)モノクローナル抗体を産生するハイブリッド細胞系の製造に用いる体細胞融合の技法は、単一の抗原決定基に対し明確な特異性を持つている無制限の数の均一抗体産物を作る事を可能にした。抗体により認識されて反応する蛋白抗原決定基部分は、エピトープとして知られており明細書中でもそう呼ぶが、1ヶ或いはそれ以上の特異的エピトープを形成するアミノ酸配列から成り立っている。

糖蛋白質Pは細胞系或いはヒト癌細胞の表面で過発現される細胞膜蛋白質であり、これ等の細胞は先天的或いは後天的な複合薬物耐性(MDR)の表現型を提示している。この蛋白質の発現によって、非MDRの親細胞にとって毒性となる細胞静止(cytostatic)薬物濃度下で、細胞は活発に増殖する能力を与えられる。クローン化されたPgpのcDNAを用いての移入(transfection)の研究は、MDR表現型を伝達する際のこの蛋白質の直接的な役割を実証した(2)。Pgpはエネルギー依存性の薬物流出ポンプとして働くと考えられている。

Pgpのアミノ酸配列は、受容体細胞におけるMDR表現型を与えている遺伝子の塩基配列から推論された(2、3、4)。Pgpの二次構造は、その一次構造の解析から予想された。即ち6ヶの親水性細胞外ループと二つのATP結合配列をコードする2ヶの大きな細胞外ドメインを介して12ヶの疎水性膜貫通型ヘリックスから構成されている膜貫通型蛋白である。

Pgpに対する数多くの異なったモノクローナル抗体が単離され性格づけされた。これ等のいくつかはセンシアリー(Cenciarelli)他により再調査されている(5)。ごく最近では、Pgpの細胞質ドメインに対して特異性を持つモノクロー

ナル抗体についての記述もある(6、7、8)。然しながら、特異的なエピトープを形成しているアミノ酸配列が特徴づけられたP g pに対するモノクローナル抗体は、P g pの細胞質ドメインと反応するか或いは蛋白質のアミノ酸配列の不連続部分を含む細胞外のエピトープと反応するかどちらかである。例えばジョージ他(8)は、ハマダとツルオ(9)により報告されたモノクローナル抗体MRK-16のエピトープの位置は、アミノ酸配列から予想可能な6ケの細胞外ペプチドループの中、ふたつのループ(1番目と4番目)に存在するペプチドから成る事を決定をしている。

P g pに対するモノクローナル抗体は、診断と治療への使用が提案されてきた。例としては、ヒトの細胞上のP g p発現レベルを検査し、それによって細胞の複合薬物耐性の状態を調べたりするのに使える。またこの抗体は、P g pにより伝達されるMDRを阻止する用途もある(7)。

既知のP g pに対するモノクローナル抗体のいずれも、連続するエピトープを形成しているアミノ酸配列から成るヒト特異的な糖蛋白質Pの細胞外エピトープを認識しない。しかも、例えば低濃度でMDR細胞に発現した時或いは、MDR細胞の細胞群の割合がわずかしかない時に、P g pの低濃度を認識し得る抗体の必要性は続いている。この様なヒト特異的なエピトープやP g pの低濃度を認識し得るモノクローナル抗体は、免疫的検査にとって有効である。

上述の体細胞融合の技法を用いて、未知のヒトP g pの連続的な細胞外エピトープに対し撰択的に且つ高親和性で結合する事が出来るモノクローナル抗体(MM4.17)を分泌するハイブリドーマが得られている。

従って、本発明は連続的なエピトープを形成しているアミノ酸配列から成るヒトP g pの構造的に連続し且つ細胞上に位置するエピトープを認識するモノクローナル抗体を提供するものである。

本明細書において、ヒト“P g p”はヒトMDR1遺伝子産物を指示する。また“モノクローナル抗体”と言う語は、抗体の全分子と、FAb、F(Ab')₂、FVフラグメント及び単一ドメイン抗体を含むその抗原結合フラグメントを包含するものであり、そしてまた、ハイブリドーマ細胞系から誘導される産物に限

定するものでなく、組換えDNA技術により作られた、即ちDNA配列をコードしているクローン化された抗体から発現された場合の抗体分子と抗原結合フラグメントをも含んでいる。

抗体により認識されるエピトープを形成しているアミノ酸配列は、ヒトPgPの細胞外ループのどれかに位置している。エピトープを形成しているアミノ酸配列はヒトPgPの第4番目のループ上に位置している事が好ましい。このエピトープが、FTRIDDPETKRQNSNL（付属の配列リストの配列番号1）を持つヒトPgPペプチドに含まれる事がより好ましい。このエピトープが、配列番号1に含まれる残基2から9までの8アミノ酸残基から成るペプチドの中の5連続アミノ酸残基を包含している事がより一層好ましい。また、この5アミノ酸が、配列番号1に含まれる残基3から7までのアミノ酸残基である事が更により好ましい。

本発明の個々の具体的記述においては、モノクローナル抗体は相補性決定領域（CDRs）を含む可変ドメインのアミノ酸配列を有しており、各CDRは、後述の配列番号2と3に同じかそれに相当するCDRの変異体（即ち、モノクローナル抗体MM4.17の重鎖上の可変ドメインのCDRs）である。

配列番号2と3の中に示されるアミノ酸配列において、CDR1はアミノ酸残基32から36番まで、CDR2はアミノ酸残基51から67番まで、CDR3はアミノ酸残基100から111番までに相当する。配列番号2と3の中に示されるアミノ酸配列の残りは、枠組み領域（N末端からC末端に向ってFR1、FR2、FR3、FR4と並んでいる）から成っており、可変ドメインの抗原結合能に本質的に影響を与えずに他の枠組み領域に変える事ができる。

本明細書において、CDR配列の変異体は、参照CDR配列、例えば配列番号2と3の中に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、CDR2、或いはCDR3との相同性が少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、より一層好ましくは95%の配列を持つものである。

驚くべきことに既知のモノクローナル抗体と比較して、モノクローナル抗体MM4.17は、MDR細胞に対して非常に高い親和性を持っており、CEM-V

B L 1 0 細胞が獲得した複合薬剤耐性の最小濃度さえ検出できる (1 0 、 1 1) 。 M M 4 . 1 7 はまた C E M - V B L 1 6 細胞が獲得した複合薬剤耐性を検出できる (1 1) 。 この細胞のビンブラスチンに対する相対的抵耐性 (R R) は 6 . 2 5 である。 C E M - V B L 1 0 と C E M - V B L 1 6 細胞は、ビンブラスチンを夫々 1 0 n g / m l 及び 1 6 n g / m l 含む培地で撰択して得られた薬剤感受性 C E M 細胞系 (文献 1 1 参照、 A T C C C C L 1 1 9 として寄託済) の M D R 誘導体である。

従って特に優先する具体化においては、本発明は P g p に対して M M 4 . 1 7 と同じ結合親和性を持つ本発明のモノクローナル抗体、例えば C E M - V B L 1 0 或いは C E M - V B L 1 6 細胞、或いは同様な M D R 細胞が獲得した複合薬剤耐性を検出できるモノクローナル抗体を含んでいる。

薬剤感受性親 C E M と M D R 誘導体細胞系 C E M - V B L 1 0 、 C E M - V B L 1 0 0 の P g p に対する M M 4 . 1 7 抗体と既報の抗 - P g p 抗体 C 2 1 9 (1 5) 、 C 4 9 4 (1 5) 、 J S B 1 (1 6) 、 M R K - 1 6 (9) 及び M C 5 7 (5) の結合親和性の比較は、後述の実施例 6 に示される。 M D R 細胞系 C E M - V B L 1 0) 、 C E M - V B L 1 6 及び C E M - V B L 1 0 0 は、ベック他 (1 1) により記載されたものでありまた彼等から入手できる。ベック他の記載のようにして、同様の M D R 細胞系は事実上得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は標準的な技法で調製され得る。ハイブリドーマ細胞系は、ヒト M D R 細胞で免疫した動物から得た脾臓細胞を用いて体細胞融合の技法により調製され得る。適当なヒト M D R 細胞系は、ベック等 (1 1) により記載された M D R 細胞系 C E M - V B L 1 0 0 、或いは類似の M D R 細胞系の様な薬剤感受性親細胞系から誘導された M D R 細胞系を含めて用いる事ができる。 C E M - V B L 1 0 0 は A T C C C C 1 1 1 9 としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された薬剤感受性 C E M 細胞系の M D R 誘導体である。

より簡便には、ヒト P g p の細胞外ドメインに相当するペプチド或いはそのフラグメントを免疫化に用いる事ができる。適当なヒト P g p の細胞外ドメインペプチドは用いる事ができる。例として、配列番号 1 のペプチド或いは上述した

その断片の様な、P g p の第4ループに対応するペプチド或いはその断片は抗原として用いる事ができる。

好ましくは高い親和性のモノクローナルの世代を促進する免疫化の操作、例えばシャンフリグリア他の方法(12)及び類似の操作が用いられる。

目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、薬剤感受性細胞と比較してヒトMDR細胞に選択的に結合する能力と、構造的に連続して細胞表面に位置するエピトープに特異的である細胞に対する選択により同定する事が出来る。

ヒトP g p の構造的に連続的な細胞外ドメイン或いは、その部分に対し対応するペプチド、例えば上述の好ましいペプチドを、目的のモノクローナル抗体を選抜するのに用いる事が好ましい。

モノクローナル抗体は細胞培養と腹水技法を用いてハイブリドーマ細胞系から調製される。抗体フラグメントは酵素的切断の様な適当な技法を用いて調製される。組換え型産物は、分子全体かフラグメントのモノクローナル産物をコードするDNA配列を用いて、適当な宿主細胞の形質転換か細胞内への移入、及び目的産物を作る為の形質転換された宿主細胞の培養を含む操作により作られる。

免疫蛍光法か免疫化学法により正常並びに腫瘍組織中のP g p の存在を検出したり、また試験管内テストでMDR表現型により細胞を同定したり、更にP g p が存在する特異的細胞集団(幹細胞、HIVで感染された細胞、Tリンパ球)を濃厚にする方法に対して、本抗体を有効的に使用する事が出来る。

従って本発明はまた、適当に標識された、例えば蛍光標識された本発明に従うモノクローナル抗体および免疫精製或いは免疫濃縮にとって適した形状、例えばモノクローナル抗体がポリマー粒子の様な適当な固相に固定化された形状の製品を含んでいる。

本発明のモノクローナル抗体を産生する、形質転換した宿主細胞系を含むハイブリドーマや他の細胞系は、また本発明に含まれる。

MDR細胞或いはヒトP g p を検出する為の本発明のモノクローナル抗体を特異的な試薬として含んでいる免疫的診断薬キットは、また本発明に含まれる。この様なキットは、代表的には本発明の適当に標識されたモノクローナル抗体、例

えば蛍光標識の抗体を含んでいる。

本発明はまた、不均一な細胞集団に存在するヒトP g pを発現している細胞の同定或いは精製に対する本発明のモノクローナル抗体の使用を含んでいる。

更に本発明はまた治療薬剤、例えばMDRを逆転させるための、本発明のモノクローナル抗体の使用および本モノクローナル抗体を含む治療用組成物を含む。本モノクローナル抗体は、MDRにより提示された癌処置を含む臨床の問題のいずれの状況においても用いる事ができる。治療の成分は、代表的には調剤的に受入れ可能な担体或いはエキシピエント(excipient)と組合せた本発明に従う抗体を含んでいる。

本発明は、生きたままのCEM細胞と、そのMDR変異株上のヒトP g p発現をFACSで解析した結果を示めすグラフである添付した図で指示している以下の実施例において図解のみにより記述される。FACSの解析はモノクローナル抗体MM4.17(1は薬物感受性CEM、2はCEM-VRL20、3はCEM-VRL40、4はCEM-VRL80、5はCEM-VRL100。横座標は蛍光強度、縦座標は細胞数)を用いて決定された。

実施例

実施例1

マウスの免疫化及び脾臓細胞とミエローマ細胞系Sp2-01/Ag.14(ATCC CRL 1581)のハイブリッド形成

性質が既知でCEM-VBL100として知られているヒトTリンパ芽球細胞系のMDR変異体でBALB/cマウスを免疫する(11)。CEMの親細胞系(ATCC CCL 119)からのCEM-VBL100細胞の誘導はベック他(11)により述べられており、この細胞系及びCEMの他のMDR誘導系はベックから入手できる。CEM-VBL100系の細胞はビンブラスチン100 ng/ml又は比較的高濃度の多くの細胞静止剤存在下、活発に増殖する。親和性の高いモノクローンを得るための免疫操作は、大体はシャンフリグリア他(12)による方法を用い、適当に改良した。免疫化操作は次のとおりである、すなわちPBSに再懸濁した 1×10^7 個のCEM-VBL100細胞を、生きたまま前処理なしで、

15日毎に10ヶ月間腹膜内に投与する。最終回の免疫では、処置したマウスからとる脾臓細胞の細胞融合の3日前に、 2×10^7 個の細胞(PBSに再懸濁する)をそれぞれ尾静脈及び腹膜内に同数ずつ投与する。

25×10^6 個の脾臓細胞は、無血清培地で十分に洗浄した後、リンパ球と同様の方法で前処理した 10×10^6 個のSp2-01/Ag.14ミエローマ細胞(ATCC CRL 1581)と、試験管内で混合する。

その後、脾臓細胞とミエローマ細胞の混合物は、シャンフリグリア他(12)の方法で処理する。要約すると、得られた異核共存体をマイクロタイター・プレート(コスター)上に配置し、HAT培養培地(H=ヒポキサンチン、A=アミノプテリン、T=チミジン、ギブコ)中で選別した後、クローン化されたハイブリドーマを得る。細胞増殖を認めた細胞培養液の上澄液は、CEMの薬剤感受性の親細胞系(ATCC CCL 119)と、また同時にCEM-VBL100変異体と間接免疫蛍光法により試験を行い、MDR免疫細胞と選択的に反応し、薬剤感受性の親細胞系とは交叉反応しない免疫グロブリンを分泌するハイブリドーマを同定する。このように選別したハイブリドーマ細胞系から、イソタイプIgG2a、kの免疫グロブリンを分泌し、MM4.17として知られる細胞系を同定した。この系はCEM-VBL100細胞に反応性が高いが、これは、図1に示すように、強い免疫蛍光シグナルにより証明され、流動細胞蛍光定量法により決定された。流動細胞計測法は、FITCを結合したF(Ab')₂抗マウスIgG(カベル、ウエスト・チェスタ、PA、USA)による標準的な方法を用いて行った。染色後、細胞を1%ホルムアルデヒドを含むpH7.2のPBSで固定し、488nmの一定波長の光を放射する15nWのアルゴン・イオン・レーザーを備えたベンチ・トップ・フロー・サイトメーター(FACScan、ベクトン・ディキンソン)により分析した。

BALB/cマウスの腹膜洗浄により得られた栄養分供給のための単層細胞(支持細胞層)の細胞1個につき0.5個の濃度で、MM4.17ハイブリドーマを96穴マイクロタイター・プレートに植えつける。HTを含む培地(100 μ L)を各穴に加え、10~14日間培養した後、クローンを上記の方法により更に2回

サブクローニングする。サブクローンはクローン化されていない系により産生されたものと同じ性質の抗体を分泌する。

MM4.17ハイブリドーマは、上澄液から大量のモノクローナル抗体を得るため試験管内で培養し、腹水形成を促進するため、フロイント不完全アジュバントで前処理した同系のBALB/cマウスに注射する。

マウスの免疫化及びハイブリドーマ細胞系の選別には、CEM-VBL100の代わりに、同様のMDRヒト細胞なら何を用いてもよい。

実施例2

モノクローナル抗体MM4.17のヒトMDR1-P-糖蛋白質の特性

ハイブリドーマ細胞系MM166.4.17(MM4.17として既知)の上澄液は、CEM細胞のヒトMDR変異体とのみ結合し(文献10及び11に記載)、CEMの薬剤感受性の親細胞系とは全く反応しない。2サイクルのクローニングの後、IgG2a)kモノクローナル免疫グロブリンを分泌するクローン化したハイブリドーマ細胞系を単離し、性質を調べ、ハイブリドーマ・セル・バンクを無マイコプラズマの大量培養により確立する。このセル・バンクからバイアル試料を解凍し、ハイブリドーマ細胞の安定性、無菌性及び特異性について試験した。更にワーキング・セル・バンクも作製し、そこから性質の一貫したかつ均一のバッチのモノクローナル抗体が、精製した又は粗製の形で得られる。図1は、CEM細胞及び様々なレベルの相対耐性(RR)を有するCEM細胞のMDR変異体に対する、モノクローナルMM4.17の蛍光特性を示す。これらのデータからMM4.17がごく低いレベルのRR及びMDR細胞でのP-糖蛋白質の発現の変異を認識する能力をもつことが明らかである。MM4.17モノクローナルは、試験した種々のヒト細胞系のMDR変異体のみを強く染色し、齧歯類由来の細胞は薬剤感受性のものでも薬剤耐性のものでも有意に染色しない。MM4.17抗体の特異性は体細胞遺伝学の研究によっても確かめられる。齧歯類の薬剤感受性細胞系とCEM-VBL100細胞の体細胞融合により得られる相互に特異的なハイブリッドは、MDRの表現型に従い、MDR1遺伝子及びMM4.17抗体により認識される抗原決定基を分離する。

実施例 3

MM4.17抗体により認識される糖蛋白質Pのエピトープの同定

ヒト又はマウスの糖蛋白質P（2、3、4）の細胞外に位置するドメインをコードするcDNA都分から推定されるアミノ酸配列をもつペプチドを合成する。これらのペプチドを、MM4.17抗体を分泌するハイブリドーマの培養上澄液と処理する。Pgp（配列番号1）の4番目の細胞外ループの739から754番目の残基に対応するペプチドが、MM4.17抗体と反応する能力があるということを示すのにELISA試験が用いられる。予想したP-糖蛋白質の細胞外のドメインによるその他のペプチドは、抗体とは反応しない。また、予想されるマウスのmdr1細胞外ドメインの同等の部分に対応するマウスのペプチドとは結合を検出できなかった。例えば、ヒトとマウスのペプチド配列には比較的高度の相同性があるにもかかわらず、MM4.17は、マウスのmdr1-P-糖蛋白質の4番目の細胞外ループの分枝を表現するペプチドとは交叉反応しない。

MM4.17抗体と反応する能力を有する最小の配列を明らかにするために、配列番号1に含まれ、部分的に重複する一連の70個のテトラペプチドからデカペプチドまでのペプチドを合成し、MM4.17抗体とのELISA試験に供した。一連のペプチドは、テトラペプチドからデカペプチドまでを含む10個の組からなり、最初の組は配列番号1の1番目から4番目のアミノ酸残基に対応するテトラペプチドと、1番目から10番目のアミノ酸残基に対応するデカペプチドからなり、2番目の組は配列番号1の2番目から5番目のアミノ酸残基に対応するテトラペプチドと、2番目から11番目のアミノ酸残基に対応するデカペプチドからなり、以下それぞれ連続したテトラペプチドからデカペプチドまでの組からなる。ELISA試験の結果、配列番号1の2番目から9番目の残基を構成するオクタペプチドが最適かつ最小のエピトープであることがわかった。最初のスレオニンそして更には最後のスレオニンの欠損が、MM4.17抗体との結合能が顕著に欠如していることの原因である。種々のペプチドの抗体結合の分析により次のことが明らかとなった：（1）最適かつ最小の配列がどちらの方向に伸張しても結合は有意に減少する：（2）配列番号1の4番目から9番目の残基を構成す

るヘキサペプチドは、結合能のある全ペプチドで見出されるので、抗体認識部位の中核部分を表現している；(3) MM4.17抗体の特異性は、配列番号1の3番目から8番目、4番目から9番目、4番目から8番目からなるペプチドのような短いものから得られた結合能の値が大変有意である点で際立っている。

実施例4

MM4.17のヒトMDR1遺伝子産物に対する特異性

MM4.17モノクローナル抗体のmdr特異性は、最適最小ペプチド内の特異的なエピトープ形成アミノ酸配列に対する相同性により選別された他の哺乳類の、p-糖蛋白質遺伝子の予測されるアミノ酸配列のオクタペプチドとの結合を試験することにより決定できる。MM4.17モノクローナル抗体は、ヒトmdr遺伝子族MDR3(マウスのmdr2やハムスターのpgp3糖蛋白質中に同一の配列がある)とも、MDR1最適最小エピトープ形成ペプチドに最も類似したマウスのmdr1、mdr3及びハムスターのpgp1、pgp2 P-糖蛋白質ペプチドとも結合しない。

実施例5

MM4.17抗体の重鎖の可変領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列の同定

オーランディ他(14)の報告にあるように、MM4.17の重鎖の可変ドメイン及びその超可変部分のcDNA配列がコーディングされた。そのcDNA及び対応するアミノ酸の予想配列は、配列番号2の中に下記のように示され、そのアミノ酸配列単独で配列番号3とする。相補性決定領域(CDR)は、配列番号2及び3に示す重鎖可変ドメインのアミノ酸配列の51残基目から67残基目(CDR2)及び100残基目から111残基目(CDR3)である。

実施例6

MM4.17のMDR及び薬剤感受性細胞上のPgpに対する結合親和性の、既出のモノクローナルとの比較

MM4.17及び既出のモノクローナルC21、C494、JSB1、MRK-16及びMC57について、抗体の蛍光ラベル体の染色の度を測定する流動細胞計測法により、CEM、CEM-VBL10及びCEM-VBL100への

結合を比較した。得られた結果を下表に示す。モノクローナルは精製した形で同じ蛋白質濃度（ $10\mu\text{g}$ ）で用いた。その結果から、MM4.17はMDR細胞系に対して実質上高い結合親和性を有し、CEM-VBL10細胞系に確実に結合するモノクローナルであることが明らかである。

表

モノクローナル抗体	P g p ドメイン	細胞			CEM/CEM-VBL10	CEM-VBL100
		CEM	CEM-VBL10	CEM-VBL100	蛍光特性	蛍光特性
C219	cyt ¹	+ ⁻²	+-	+	諾 ³	諾
C494	cyt	+-	+-	++	諾	諾
JSB1	cyt	+-	+-	+	諾	諾
MRK-16	ext ⁴	-	+-	+++	諾	否
MC57	ext	-	+-	+++	諾	否
MM4.17	ext	-	+++	++++	否	否

上記表中の参照番号は以下の意味を持っている。

1 - 細胞質エピトープ認識（細胞はモノクローナル抗体染色に対し固定されるか或いは透過性が高められる必要がある。

2 - 反応性のレベル：より高い蛍光強度を除いて染色された細胞の中、-，無；+-，5～30%；+，30以上～60%；++，60以上～90%；+++，90以上～100%；++++，100%。

3 - 細胞の蛍光特性は反応性の重複範囲を現わす。

4 - 生きたままのヒトMDR細胞中の細胞外エピトープ認識。

参考文献

1. コーラーG.とミルシュタインC.（1975）、ネイチャー、256、495
2. ウエダ他（1987）、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、84、3004-3008
3. シェーン他（1986）、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、6、4039-4044
4. シェーン他（1987）、セル、47、381-389
5. センシアリー他（1991）、インターナショナル・ジャーナル・オブ・キヤンサー、47、533-544

6. アセシ他(1993)、キャンサー・リサーチ、53、310-317
7. メクトナーとロニンソン(1992)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、89、5824-5828
8. ジョージ他(1993)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、268、1792-1798
9. ハマダとツルオ(1986)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、83、7785-7789
10. シャンフリグリア他(1990)、インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、45、95-103
11. ベック他(1979)、キャンサー・リサーチ、39、2070-2077
12. シャンフリグリア他(1986)、メソッド・イン・エンザイモロジー、121、193-210
13. ウイラー他(1993)、第84回AACR年会会報、要旨No.1837、309ページ
14. オーランディ他(1989)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、86、3833-3837
15. カートナー他(1985)、ネイチャー、316、820-823
16. シェパー他(1988)、インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、42、389-394

配列表

(1) 一般情報:

(I) 出願人:

(A) 名称: イスティテュート・スペリオーレ・ディ・サニタ

(B) 街: ビアレ・レジナ・エレナ299番

(C) 市: ローマ 00161

(E) 国: イタリア

(F) 郵便番号(ジップ): 00161

(G) 電話: 003964444990

(H) テレファックス : 003964440067

(I) テレックス : RM610071

(II) 発明の標題 : 糖蛋白質 P に対するモノクローナル抗体

(III) 配列の数 : 4

(IV) コンピューター解説形式 :

(A) 媒介様式 : フロッピーディスク

(B) コンピュータ : IBM PC 適合

(C) 操作システム : PC-DOS / MS-DOS

(D) ソフトウェア : パテントイン リリース #1.0、バージョン

#1.25 (EPO)

(V) 現出願データー : 出願番号 : WO PCT / EP 93 /

(2) 配列番号1の情報 :

(I) 配列の特性 :

(A) 長さ : 16 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) 位相 : 線状

(II) 分子様式 : ペプチド

(III) 仮説 : 否

(V) 断片様式 : 内部

(VI) 原材料 :

(A) 有機体 : ホモサピエンス

(XI) 配列記述 : 配列番号1 :

Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu

1

5

10

15

(2) 配列番号2の情報

(I) 配列の特性 :

(A) 長さ : 369 塩基対

(B) タイプ : 核酸

(C) 鎮：一本

(D) 位相：線状

(II) 分子様式：DNA (ゲノム)

(III) 仮説：否

(IV) アンチ・センス：否

(V) 断片様式：内部

(VI) 原材料：

(A) 有機体：ムス (Mus) 筋

(B) 系統：BALB/c

(IX) 特徴：

(A) 名前／鍵：CDS

(B) 位置：1..369

(IX) 配列記述：配列番号2：

CAG GTC CAA CTG CAG GAG TCT GGA GGA GAC TTA GTG AAG GAT CCT GGA	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Asp Pro Gly	
1 5 10 15	
GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGA	96
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg	
20 25 30	
TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAC AAG AGG CTG GAG TGG	144
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp	
35 40 45	
GTC GCA ACC ATT AGT AGC GGT GGT AGT TAC ACC TAC TTT CCA GAC AGT	192
Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Ser	
50 55 60	
GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG	240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu	
65 70 75 80	
TAC CTG CAA GTG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC	288
Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr	
85 90 95	

TGT GCA AGA CCT GCG GAA TTT AGG GGT TAC TCC TGG TTT GCT TAC TGG 336
 Cys Ala Arg Pro Ala Glu Phe Arg Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT 369
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120

(2) 配列番号3の情報

(I) 配列の特性:

(A) 長さ: 123 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) 位相: 線状

(II) 分子様式: 蛋白質

(XI) 配列記述: 配列番号3:

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Asp Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
 20 25 30

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Ser
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Pro Ala Glu Phe Arg Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120

(2) 配列番号4の情報:

(I) 配列の特性:

(A) 長さ: 8 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) 位相：線状

(II) 分子様式：ペプチド

(III) 仮説：否

(V) 断片様式：内部

(VI) 原材料：

(A) 有機体：ホモサピエンス

(XI) 配列記述：配列番号4：

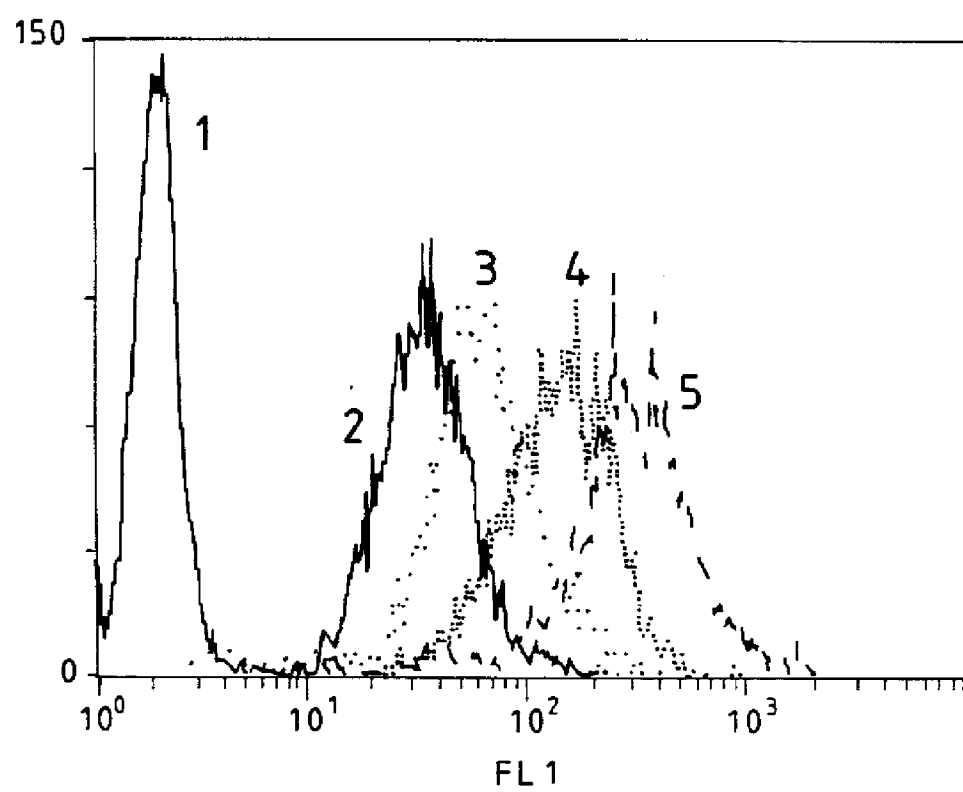
Gly Pro Gly Asp Asp Ala Val Lys

1

5

【図1】

FIGURE



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年6月10日

【補正内容】

請求の範囲

1. エピトープを形成する連続的アミノ酸配列から成るヒトP g pの構造上連続して細胞外に位置するエピトープを認識し、また実施例6において前述した如く、流動細胞計測法の実験において実質的にテストされた時に、P g pに対して生きているCEM-VBL10細胞の90%以上染める事ができる結合親和性を持つモノクローナル抗体。

2. エピトープを形成するアミノ酸配列が、ヒトP g pの第4の細胞外ループに位置している、請求項1記載のモノクローナル抗体。

3. エピトープを形成するアミノ酸配列が、配列番号1のペプチドに含まれる、請求項2記載のモノクローナル抗体。

4. エピトープを形成するアミノ酸配列が、配列番号1の残基2から9までから成る8アミノ酸配列の中で少なくとも5残基連続したアミノ酸を含む、請求項3記載のモノクローナル抗体。

5. 5残基連続したアミノ酸が配列番号1の残基3から7までである、請求項4記載のモノクローナル抗体。

6. 重鎖可変ドメインのアミノ酸配列が配列番号2或いは3であるCDR自身かCDR変異体を有する可変ドメインを含むヒトP g pのモノクローナル抗体。

7. 各CDRが配列番号2或いは3に対応するCDRと少なくとも70%相同である、請求項6記載のモノクローナル抗体。

8. 蛍光標識されたか、或いは固相上に固定化された、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

9. ヒトMDR細胞、或いはヒトP g pの細胞外ドメインもしくはそのフラグメントに対応するペプチドで免疫された動物から得た脾臓細胞の体細胞融合を含む、請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体の調製方法。

10. 構造的に連続するヒトP g pの細胞外ドメイン、もしくはその一部に対応するペプチドが、目的のモノクローナル抗体の選出に用いられる、請求項9

記載の方法。

11. 請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブ

リドーマおよび形質転換された宿主細胞系。

12. ヒトMDR細胞、或いはヒトPgPを検出する為に請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体を特異的試薬として含む、免疫的診断キット。

13. 不均一な細胞集団の中に存在してヒトPgPを発現する細胞を生体内で同定、或いは精製する為の、請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

14. 治療剤としての、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

15. MDRを逆転させるための、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

16. 治療剤として利用する為の、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

17. 薬理学的に許容可能な担体或いはエキシピエント (excipient) と組合せた請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む、治療用組成物。

18. MDRを逆転するための薬剤を調製する為の、請求項1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体の利用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 93/01533

International Application No.

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁴		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. 5 C12P21/08; C12N5/20; G01N33/574; G01N33/577 A61K39/395		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁵		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. 5	C12P ; C12N ; G01N ; A61K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁶		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁷		
Category ⁸	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JOURNAL OF CELLULAR PHARMACOLOGY vol. 2, no. 3, 1991, BERLIN, GERMANY pages 165 - 170 M. CHEVALLIER-MULTON ET AL. 'Importance of the fourth external loop in immunogenicity of the multidrug resistance related P glycoprotein.' see the whole document	1-17
P, X	PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, ANNUAL MEETING. vol. 34, no. 0, March 1993, page 317 M. CIANFRIGLIA ET AL. 'Precise mapping of a contiguous human-specific epitope in the fourth loop of the P glycoprotein.' see abstract 1889	1-17
<p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
25 AUGUST 1993		23 -09- 1993
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of Authorized Officer NDOIJ F.J.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01533

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark : Although claims 15 & 16 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	片内整理番号	F I
G 0 1 N 33/574	A	8310-2 J	
33/577	B	8310-2 J	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US